ดยะห์ วูลันดารี : สภาวะพึ่งพาอาศัยของแบรดี้ไรโซเบียมที่ไม่สร้างปม*BRADYRHIZOBIUM COSMICUM* S23321 หลังจากการส่งถ่ายเมกะพลาสมิด PDOA9 (SYMBIOTIC MEGAPLASMID OF *BRADYRHIZOBIUM* SP. DOA9 AFFECTING LEGUME-RHIZOBIA SPECIFICITY IN NON SYMBIOTIC *BRADYRHIZOBIUM COSMICUM* S23321) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง, 182 หน้า.

พลาสมิดขนาดใหญ่ pDOA9/*Bradyrhizobium* sp. DOA9/*Bradyrhizobium cosmicum* S23321

พลาสมิดขนาดใหญ่ DOA9 (pDOA9) ที่มียีน *nod, nif* และ Type three secretion system (T3SS) ถูกพบในเชื้อแบคทีเรีย *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ DOA9 เป็นครั้งแรก ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อส่งถ่ายพลาสมิด pDOA9 ไปสู่เชื้อแบคทีเรีย *Bradyrhizobium* โดยใช้เชื้อสายพันธุ์ ORS278 ที่มีพลาสมิด pDOA9 เป็นเชื้อส่งถ่าย pDOA9 ไปสู่เชื้อ *B. cosmicum* S23321 ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่มียีน *nod,* และ T3SS/T4SS จากผลการทดลองพบว่า สมบัติการสร้างปมในพืชจากเชื้อสายพันธุ์ ORS278 และ S23321 ที่มี pDOA9 มีสมบัติการสร้างปมที่แตกต่างจากเชื้อ DOA9 ถึงแม้ว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์จะมีพลาสมิด pDOA9 เหมือนกัน โดยพบว่า pDOA9 เป็นสาเหตุการยับยั้งการสร้างปมโดยเชื้อ ORS278 แต่ เชื้อ S23321 ที่มี pDOA9 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืชตระกูลถั่ว การศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อ S23321 ที่ได้รับพลาสมิด pDOA9 (S23321:pDOA9) สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืชตระกูลถั่วได้ 2 ลักษณะคือ ยีน *nod* บน pDOA9 ทำให้ลดความจำเพาะต่อเกิดปฏิสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืชตระกูลถั่ว และสามารถสร้างปมกับถั่วลิสง (*Arachis hypogea*) (Dalbergoid)) ถั่วเขียว (*Vigna radiata* cv. SUT4 (Millitoid)) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่เชื้อ DOA9 สร้างปมที่ตาย (necrotic nodule) กับถั่วเขียว ลักษณะที่สองคือ ระบบ T3SS มีผลต่อประสิทธิภาพการเกิดปฏิสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยผลของการสร้างปมของเชื้อ S23321 ที่มี pDOA9 (S23321:pDOA9ΩrhcN) มีความสอดคล้องกับเชื้อ DOA9 คือ เมื่อทำลายการทำงานของระบบ T3SS ทำให้ลักษณะของการสร้าปมกับ *Crotalaria juncea* ดีขึ้น นอกจากนี้ การทำลายการทำงานของยีนที่เกี่ยวกับการสร้างปม (nodulation genes) (S23321:pDOA9Ω*nodB*) ส่งผลให้ยับยั้งการสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วทุกสายพันธุ์อย่างสมบูรณ์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า พลาสมิด pDOA9 ได้รับการปรับเปลี่ยนให้ขยายความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัยให้กว้างขึ้น โดยอาจเกิดไปพร้อมกับวิวัฒนาการของพืชตระกูลถั่ว และการเข้าสร้างปม ซึ่งขึ้นอยู่กับชุดโครโมโซมของผู้รับพลาสมิด รวมถึงข้อจำกัดของพืชตระกูลถั่ว

นอกจากนี้อีกหนึ่งวัตถุประสงค์ ต้องการทราบบทบาทที่แน่ชัดของกลุ่ม *nod* ยีนบนเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. DOA9 ประกอบด้วยยีน *nodA* 2 ชุด คือ *nodA1* และ *nodA2* และยังมียีน

nodD 2 ชุด คือ *nodD1* และ *nodD2* โดยบทบาทของชุดยีนดังกล่าวยังไม่มีการศึกษามาก่อน ผลการทดลองพบว่า การทำลายการทำงานของยีน *nodD1* หรือ *nodD2* เพียงยีนเดียว ไม่มีผลต่อลักษณะของพืชเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยเชื้อ DOA9 โดยเชื้อที่ทำลาย *nodD1* (**Ω***nodD1*) และ *nodD2* (**Ω***nodD2*) ไม่ทำให้ระดับการสร้างปม น้ำหนักแห้งพืช และระดับการตรึงไนโตรเจนลดลง ผลของเชื้อที่ทำลายการทำงานของยีน *nodA1* (**Δ***nodA1*) และ *nodA2* (**Δ***nodA2*) พบว่ายีน *nodA1* ไม่ใช่ตัวกำหนดสมบัติการสร้างปมของเชื้อ DOA9 ผลการทดสอบพืชพบว่า **Δ***nodA1* ไม่มีผลต่อการลดจำนวนปม น้ำหนักแห้ง และระดับการตรึงไนโตรเจน ในขณะที่ ยีน *nodA2* มีบทบาทสำคัญต่อการเข้าสร้างปมของเชื้อ DOA9 เชื้อ **Δ***nodA2* ไม่สามารถสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ การวิเคราะห์โครงสร้าง Nod-Factors (NFs) ของเชื้อ DOA9 พบว่ามีโครงสร้างคล้ายกับ NFs ที่พบในเชื้อ *Rhizobium* sp. NGR234 ในขณะเชื้อ **Δ***nodA2* ไม่พบการสร้าง NFs สำหรับเชื้อ **Δ***nodA1* พบว่า NFs ที่สร้างมีเพียงโมเลกุลหลักที่คล้ายกับ NFs ที่พบใน DOA9 แต่ไม่พบ NFs ที่มี C18:1 acyl group จากผลดังกล่าวสรุปได้ว่า DOA9 ใช้ชุดยีน *nodD1* และ *nodD2* เพื่อกระตุ้นการการลอกรหัสพันธุกรรมชุดยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างปม ยีนทั้ง 2 มีการทำงานที่ซ้ำซ้อนกัน สมบัติการเข้าอาศัยร่วมกับพืชที่หลากหลายของเชื้อ DOA9 นี้ เป็นไปได้ว่ามาจากการที่จำนวนชุดยีน *nod* หลายชุด ซึ่งมีผลต่อของโครงสร้าง NFs

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

DYAH WULANDARI : SYMBIOTIC MEGAPLASMID OF *BRADYRHIZOBIUM* SP. DOA9 AFFECTING LEGUME-RHIZOBIA SPECIFICITY IN NON SYMBIOTIC *BRADYRHIZOBIUM COSMICUM* S23321. THESIS ADVISOR : PROF. NEUNG TEAUMROONG, Dr. rer. nat., 182 PP.

SYMBIOTIC MEGAPLASMID pDOA9/*Bradyrhizobium* sp. DOA9/*Bradyrhizobium cosmicum* S23321

The megaplasmid DOA9 (pDOA9) carrying *nod, nif, fix* and T3SS genes was first found in *Bradyrhizobium* sp. DOA9. This study aimed to transfer the pDOA9 from DOA9 into different background chromosomes than DOA9 and *Bradyrhizobium* sp. ORS278. The chimeric ORS278 carrying pDOA9 was used as a donor for transferring pDOA9 to the *B. cosmicum* S23321 which is free-living with the absence of *nod,* T3SS and T4SS genes. The result of plant nodulation was varied among DOA9, chimeric ORS278 and S23321 strains even though it carried the same symbiotic plasmid pDOA9. The pDOA9 brings incompatible factors on legume symbiosis in chimeric ORS278, but the result in chimeric S23321 is able to contribute the symbiosis compatibility on legumes. This study indicated that S23321 was able to gain the symbiotic function of pDOA9 in two manners. Firstly, the *nod* genes broaden the host range in all legumes tested and successfully formed the active nodule with *Arachis hypogea* (Dalbergoid) and *Vigna radiata* cv. SUT4 (Millitoid), while the DOA9 wild type only performs necrotic nodule in *V. radiata* SUT4. Secondly, the Type three secretion system (T3SS) affects the degree of effectivity in symbiosis. The chimeric mutant T3SS (S23321:pDOA9Ω*rhcN*) congruence with DOA9, mutation in T3SS gave better nodulation in *Crotalaria juncea*. Besides, the mutation of nodulation gene (S23321:pDOA9Ω*nodB*) completely abolished the nodulation in all tested legumes. These outcomes implied that pDOA9 has been decorated for broadening host specificity along with legumes evolution time and the compatibility of nodulation depending on the background of the chromosome of the recipient as well as the legumes host restriction.

Bradyrhizobium sp. DOA9 is the broad host range with divergent *nod* containg strain. DOA9 carry two copies of *nodA* genes, *nodA1* and *nodA2* as well as two copies of *nodD* genes, *nodD1* and *nodD2*. The roles of both genes remained to be elucidated. The result showed that the mutation of a single copy of *nodD1* (**Ω***nodD1*) or *nodD2* (**Ω***nodD2*) resulting in a plant phenotype similar to DOA9 WT. **Ω***nodD1* or **Ω***nodD2* were not significantly reduced in nodule number, plant dry weight and nitrogen fixation. **Ω***nodD1* and **Ω***nodD2* showed functionally redundant. The result of **Δ***nodA1* and **Δ***nodA2* showed that the *nodA1* was not the symbiotic determinant in DOA9 nodulation. The plant test showed that **Δ***nodA1* was not significantly reduced in nodule number, plant dry weight, and nitrogen fixation but the *nodA2* played an important role in the general nodulation of DOA9. **Δ***nodA2* showed aborted nodulation in all plant tests. Analysis of Nod-Factor (NF) of DOA9 shares high similarity to the major NF of the *Rhizobium* sp. NGR234. Analysis of the **Δ***nodA2* revealed that no NFs were detected either in the conditions with or without flavonoid induction in the mass spectrometry (MS) positive mode. In **Δ***nodA1*, NFs were found but the main identified molecule was not similar as in DOA9 WT and the NF bearing the C18:1 acyl group was not detected. In conclusion, DOA9 required both copies of *nodD1* and *nodD2* for activation of *nod* genes transcription, both genes showed functionally redundant. The broad host range properties of DOA9 possibly derived from the decoration of the core *nod* genes that affect the NF structure functions.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2021

Student's Signature _____
Advisor's Signature _____
Co-advisor's Signature _____
Co-advisor's Signature _____